

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

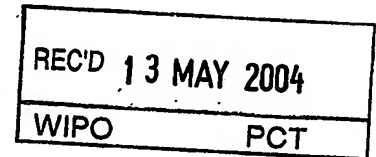
PCT/JP 03/15418
02.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 2 月 1 3 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 6 3 0 1 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 6 3 0 1 4]



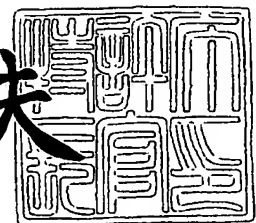
出 願 人 独立行政法人 科学技術振興機構
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 2 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 9 5 3 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 Y2002-P281

【提出日】 平成14年12月13日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12
A61K 38/00
G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区高野東開町 1 - 2 3 東大路高野第 3
住宅 4 3 棟 2 0 5 号

【氏名】 乾 賢一

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区松ヶ崎井出ヶ海道町 5 - 1 G R A
C E と一べえ 4 0 3 号室

【氏名】 増田 智先

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013099

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコーストランスポータ NaGLT1 及びその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなることを特徴とする DNA。

【請求項 2】 請求項 1 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする DNA。

【請求項 3】 以下の (a) 又は (b) のポリペプチドをコードする DNA ;

(a) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチド

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド。

【請求項 5】 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチド。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 3 記載の DNA を、発現ベクターに組込み、該組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して発現することを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドの製造法。

【請求項 7】 請求項 4 又は 5 記載のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体。

【請求項 8】 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 記載の抗体。

【請求項 9】 抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 記載の抗体。

【請求項 10】 請求項 1 ～ 3 のいずれか記載の DNA を動物組織細胞に導

入することを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法。

【請求項 11】 動物組織細胞が、ラット腎臓の組織細胞、ブタ腎臓由来上皮細胞、イヌ腎臓由来上皮細胞、又はフクロネズミ腎臓由来上皮細胞であることを特徴とする請求項 10 記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法。

【請求項 12】 動物組織細胞が、ヒト胎児腎臓の形質転換細胞株 HEK 293 であることを特徴とする請求項 10 記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法。

【請求項 13】 請求項 10～12 のいずれか記載の方法により製造されたことを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞。

【請求項 14】 請求項 13 記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞を用いて、被研物質のグルコース輸送機能への影響を測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能調節活性を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項 15】 配列表の配列番号 2 に示されるグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする腎におけるグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物。

【請求項 16】 グルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能の欠損が、配列表の配列番号 1 に示されるグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子の機能の欠損であることを特徴とする請求項 15 記載の腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物。

【請求項 17】 請求項 15 又は 16 記載の腎におけるグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物、或いは該モデル非ヒト動物の細胞、組織又は器官におけるグルコース再吸収能を測定・評価することを特徴とするグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 18】 請求項 1 記載の塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるグルコーストランスポータ機能診断用プローブ。

【請求項 19】 請求項 1～3 のいずれか記載の DNA の少なくとも 1 つ以上を固定化させたことを特徴とするグルコーストランスポータ機能診断用マイクロアレイ又は DNA チップ。

【請求項 20】 請求項 7～9 のいずれか記載の抗体及び／又は請求項 18 記載の診断用プローブを用意することを特徴とするグルコーストランスポータ機能診断用薬剤。

【請求項 21】 被検組織から試料を得、該試料における請求項 1 記載の遺伝子の発現を測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法。

【請求項 22】 請求項 21 記載の遺伝子の発現の測定を、請求項 18 記載のグルコーストランスポータ機能診断用プローブ、或いは請求項 19 記載のグルコーストランスポータ機能診断用マイクロアレイ又は DNA チップを用いて行うことを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法。

【請求項 23】 被検組織から試料を取得、培養し、該試料における遺伝子の発現により生成される請求項 4 記載のポリペプチドを測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法。

【請求項 24】 請求項 23 記載のポリペプチドの測定を、請求項 7～9 のいずれか記載の抗体を用いて行うことを特徴とするグルコーストランスポータ機能の診断方法。

【請求項 25】 請求項 21～24 のいずれか記載のグルコーストランスポータ機能の診断が、腎疾患におけるグルコーストランスポータ機能の測定であることを特徴とする腎疾患の診断方法。

【請求項 26】 動物組織細胞に、請求項 1～3 のいずれか記載の DNA を導入することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節方法。

【請求項 27】 動物組織細胞における請求項 1 記載の DNA の発現を抑制することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調

節方法。

【請求項 28】 動物組織細胞における請求項 1 記載の DNA の発現の抑制が、請求項 1 記載の DNA 塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部を動物組織細胞に導入することにより行われることを特徴とする動物組織細胞グルコーストランスポータ機能の調節方法。

【請求項 29】 動物組織細胞が、動物腎細胞であることを特徴とする請求項 26～28 のいずれか記載の動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、グルコーストランスポータ、その遺伝子、その変異体、及びそれらの利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトの腎臓は 2 つ合わせても体重のわずか 0.5% に過ぎないが、心拍出量の約 20%、即ち毎分 1～1.2 L もの血液が流れ込んでいる。その血漿流量の約 20%、即ち毎分 120 mL (1 日 200 L) が糸球体で濾過され原尿となるが、その 99% は尿細管で再吸収され、残りの 1.5～2 L が 1 日の尿量となる。腎臓は機能単位であるネフロンとそれを取りまく血管系から構成されている。ネフロンは糸球体に始まり、近位尿細管、中間部尿細管 (ヘンレループ細脚)、遠位尿細管を経て集合管系に至る。それぞれの分節は異なった機能と形態を有し、協同的に尿の濃縮・生成に関与している。特に、近位尿細管を構成する細胞では管腔側刷子縁膜の発達により表面積が大きいため、原尿中の水や電解質の他低分子性の栄養物質を再吸収したり、血液中の薬物や異物を分泌する際に効率的な形態となっている (月刊薬事 Vol.43, No.3, pp29-34, 2001、月刊薬事 Vol.42, No.4, pp113-120, 2000)。

【0003】

近位尿細管上皮細胞の血液側側底膜と管腔側刷子縁膜には、このように多様な

物質の再吸収と分泌を媒介するトランスポータ（輸送体）が局在し、方向選択的な物質輸送を可能とするネットワークが形成されている（*BIO Clinica*, 11, 22-25, 1996、*生体の科学*, 50, 268-273, 1999）。この数年間に、グルコースの腎排泄調節を司るグルコーストランスポータの遺伝子のクローニングと、構造・機能解析が著しく進展し、腎臓において、糸球体で尿中へ移行したグルコースが、再吸収されて血液中へ戻される機構が分子レベルで明らかにされつつある。

【0004】

即ち、血中グルコースは腎糸球体で濾過され、尿細管で再吸収を受ける。この機構により正常血糖時には、グルコースは100%再吸収され循環血中に戻る。

そこで、グルコースやアミノ酸等の水溶性分子やイオンは、リン脂質二重層からなる生体膜を速やかに通過することができないために、一般的には、細胞膜や膜小器官にはこれらの分子を特異的に輸送するための輸送タンパク質が存在する。このような細胞内外の物質輸送を行う膜タンパク質が、トランスポータであるが、トランスポータは、体内に取りこまれた薬物、栄養物等が各組織に移動する過程や、各組織に蓄積した老廃物の排出に関与している（特開2002-171980号公報）。腎臓においては、近位尿細管上皮細胞の血液側側底膜と管腔側刷子縁膜に、多様な物質の再吸収と分泌を媒介するトランスポータ（輸送タンパク質）が局在し、細胞内外に形成された膜電位差やPH勾配等の環境特性を巧みに利用した方向選択的な物質輸送を可能とするネットワークが形成されている（*BIO Clinica*, 11, 22-25, 1996、*生体の科学*, 50, 268-273, 1999）。

【0005】

脊椎動物のグルコーストランスポータは、大きく2種類に分けられる。1つは促進グルコーストランスポータ（facilitated glucose transporter: GLUT）とよばれるもので、細胞内外のグルコース濃度勾配にしたがって輸送を行う促進拡散型の輸送担体である。このタンパク質はさらに8つのアイソフォームが存在し、分子量約50,000の12回膜貫通型タンパク質である（*Annu. Rev. Physiol.* 55, 591-608, 1993、*TIBS* 23, 476-481, 1998、特開2002-218981号公報）。基本的に、すべての細胞は少なくとも1つのタイプのGLUTを発現させ、それによって必要なグルコースを細胞外から得ている。もう1つは

、 Na^+ /グルコーストランスポータ (Na^+ -glucose cotransporter: SGLT) で、 Na イオンと共役することでグルコースを濃度勾配に逆らって輸送する能動輸送担体であり、分子量約 75,000 の 14 回膜貫通型タンパク質である。

【0006】

このタンパク質は小腸と腎臓の管腔 (lumen) 側に面した上皮細胞の頂端側細胞膜 (apical membrane) に存在し、細胞内外の Na^+ の電気化学ポテンシャルの勾配を利用してグルコースを細胞内へ取り込む能動輸送を行っている (Physiol. Rev. 74, 993-1026, 1994、Am. J. Physiol. 276, (5 Pt 1), G1251-1259, 1999、特開 2002-218981 号公報)。SGLT によって上皮細胞内に取り込まれたグルコースと Na^+ は、側底膜 (baso-lateral membrane) に存在する GLUT-2 と Na^+ - K^+ ポンプの働きで血中へ放出される。

【0007】

哺乳類の SGLT は、輸送特性によって更に、SGLT-1 と SGLT-2 の二つのタイプに分類される。SGLT-1 は、糖 1 分子あたり 2 個の Na^+ イオンを輸送し、グルコースとガラクトースに対して高い親和性を持ち、小腸と腎臓で発現している。一方、SGLT-2 は糖 1 分子あたり 1 個の Na^+ イオンを輸送し、グルコースに対する親和性は低く、ガラクトースは運ばない。このタンパク質は腎臓で発現しているが、小腸での発現は確認されていない。更に、SGLT-1 と SGLT-2 は腎臓の異なる場所で機能している。糸球体で尿中へ移行したグルコースは、その多くが、まず近位尿細管の SGLT-2 で再吸収され、更に遠位尿細管の SGLT-1 で完全に再吸収され血液中へ戻される。これに対して、食物中のグルコースは総て、小腸の SGLT-1 で体内へ吸収されている。

【0008】

このように、腎臓にはグルコーストランスポータ SGLT1 及び SGLT2 が発現しており、糸球体で濾過されたグルコースの尿細管上皮細胞内への再吸収過程は、これら 2 種類のトランスポータによって媒介されると考えられている。

一方で、腎性糖尿病とされる、血漿中のグルコースの濃度が正常域 (170 mg/dL 以下) であるのに、明らかな糖尿の見られる状態がある。糸球体を通過

したグルコースが尿細管で再吸収され得る最大速度 (T_mG で表す) は正常人では毎分 350 mg であるが、これが異常に低い場合が最も多い。その結果、血漿中のグルコース濃度の高低に関係なく尿中のグルコース濃度が異常に高くなる。この現象は、近位尿細管の異常、即ち先天的あるいは後天的ファコンニ症候群のときやフロリジン注射の後などにも見られる。もう一つの腎性糖尿病の原因としては、グルコースのみかけ上の閾値が低下しているが閾値の平均値と T_mG との両者がまったく正常という場合もある。この場合に見られるグルコースの尿中への異常な排泄増加は、グルコースの血漿濃度が低い時のみに存在する。そして、最大閾値を越えた血漿レベルでのグルコースの排泄はかえって正常である (医学大辞典 第18版, pp 1059~1060, 南山堂, 1998年、生化学辞典 第2版, pp 673, 東京化学同人, 1990年)。

【0009】

腎性糖尿病は、腎臓におけるグルコース再吸収不全によると考えられており、かかるグルコース再吸収不全は、腎臓において糸球体で濾過されたグルコースの尿細管上皮細胞内への再吸収過程を媒介していると考えられている既知の2種類のトランスポータ、即ち、SGLT1及びSGLT2の先天性或いは後天性の欠損に起因すると考えられている。しかしながら、未だ原因遺伝子については同定されておらず、該既知のSGLT1及びSGLT2遺伝子とそれ以外の未だ未知のトランスポータ遺伝子の先天性或いは後天的欠損によって引き起こされると考えられてきた。

また、腎疾患を、標的或いは回避することを目的とした医薬品の開発は、腎疾患時における薬物療法をより有効かつ安全に実施するために重要であるが、今までの腎疾患の原因の解明に対する技術的な研究基盤が乏しいために、有効な成功例がないのが現状である。

【0010】

【特許文献1】

特開2002-171980号公報。

【特許文献2】

特開2002-218981号公報。

【非特許文献 1】

BIO Clinica, 11, 22-25, 1996。

【非特許文献 2】

生体の科学, 50, 268-273, 1999。

【非特許文献 3】

Annu. Rev. Physiol. 55, 591-608, 1993。

【非特許文献 3】

TIBS 23, 476-481, 1998。

【非特許文献 4】

Physiol. Rev. 74, 993-1026, 1994。

【非特許文献 5】

Am. J. Physiol. 276, (5 Pt 1), G1251-1259, 1999。

【0 0 1 1】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の課題は、腎において発現し、腎でのグルコース再吸収に関与する新規グルコーストランスポータ、その遺伝子、及びそれらの変異体、更にはそれらの利用を提供することにある。

【0 0 1 2】**【課題を解決するための手段】**

腎性糖尿病は、腎臓におけるグルコース再吸収不全によるものであり、かかる不全は既知のグルコーストランスポータ遺伝子 S G L T 1 及び S G L T 2 の先天性或いは後天性の欠損に起因すると考えられていたが、その原因遺伝子については、同定されなかった。本発明者は、この未同定の遺伝子について、鋭意探索の結果、既知の S G L T 1 及び S G L T 2 グルコーストランスポータ遺伝子とは別の腎臓で高発現する遺伝子を見出し、本発明を完成するに至った。

本発明のグルコーストランスポータは、既知の S G L T 1 及び S G L T 2 よりも高い発現量を有し、腎でのグルコース再吸収において、より大きな寄与を果たすとともに、他の単糖類は認識せずに、グルコースのみを特異的に認識するという特性を有する。本発明のグルコーストランスポータを、「グルコーストランス

ポータ NaGLT1」と命名した。

【0013】

本発明は、また、グルコーストランスポータ NaGLT1 及びその遺伝子の変異体、及び該グルコーストランスポータ NaGLT1 に特異的に結合する抗体を包含する。更に本発明は、本発明のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能を染色体上で欠損させた腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物及び該モデル非ヒト動物を用いた腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニング、更には、本発明の遺伝子や抗体を用いたグルコーストランスポータ機能や腎疾患の診断方法やそのための診断薬を包含するものである。また、本発明は、アンチセンス鎖 DNA 等を用いて、本発明の遺伝子の発現を制御し、動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能を調節する方法も包含するのである。

【0014】

すなわち具体的には本発明は、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列からなることを特徴とする DNA（請求項 1）や、請求項 1 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする DNA（請求項 2）や、以下の (a) 又は (b) のポリペプチドをコードする DNA；(a) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド (b) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチド（請求項 3）や、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とするポリペプチド（請求項 4）や、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチド（請求項 5）や、請求項 1～3 記載の DNA を、発現ベクターに組込み、該組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して発現することを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドの製造法（請求項 6）や、請求項 4 又は 5 記載の

ポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体（請求項 7）や、抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 記載の抗体（請求項 8）や、抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 7 記載の抗体（請求項 9）からなる。

【0015】

また本発明は、請求項 1～3 のいずれか記載の DNA を動物組織細胞に導入することを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法（請求項 10）や、動物組織細胞が、ラット腎臓の組織細胞、ブタ腎臓由来上皮細胞、イヌ腎臓由来上皮細胞、又はフクロネズミ腎臓由来上皮細胞であることを特徴とする請求項 10 記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法（請求項 11）や、動物組織細胞が、ヒト胎児腎臓の形質転換細胞株 HEK293 であることを特徴とする請求項 10 記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞の製造法（請求項 12）や、請求項 10～12 のいずれか記載の方法により製造されたことを特徴とするグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞（請求項 13）や、請求項 13 記載のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する動物組織細胞を用いて、被研物質のグルコース輸送機能への影響を測定することを特徴とするグルコーストランスポータ機能調節活性を有する物質のスクリーニング方法（請求項 14）や、配列表の配列番号 2 に示されるグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能を染色体上で欠損させたことを特徴とする腎におけるグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物（請求項 15）や、グルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子機能の欠損が、配列表の配列番号 1 に示されるグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現する遺伝子の機能の欠損であることを特徴とする請求項 15 記載の腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物（請求項 16）や、請求項 15 又は 16 記載の腎におけるグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物、或いは該モデル非ヒト動物の細胞、組織又は器官におけるグル

コース再吸収能を測定・評価することを特徴とするグルコース再吸収能不全に起因する腎性糖尿病予防・治療薬のスクリーニング方法（請求項 17）や、請求項 1 記載の塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるグルコーストランスポート機能診断用プローブ（請求項 18）や、請求項 1～3 のいずれか記載の DNA の少なくとも 1 つ以上を固定化させたことを特徴とするグルコーストランスポート機能診断用マイクロアレイ又は DNA チップ（請求項 19）からなる。

【0016】

さらに本発明は、請求項 7～9 のいずれか記載の抗体及び／又は請求項 18 記載の診断用プローブを用意することを特徴とするグルコーストランスポート機能診断用薬剤（請求項 20）や、被検組織から試料を得、該試料における請求項 1 記載の遺伝子の発現を測定することを特徴とするグルコーストランスポート機能の診断方法（請求項 21）や、請求項 21 記載の遺伝子の発現の測定を、請求項 18 記載のグルコーストランスポート機能診断用プローブ、或いは請求項 19 記載のグルコーストランスポート機能診断用マイクロアレイ又は DNA チップを用いて行うことを特徴とするグルコーストランスポート機能の診断方法（請求項 22）や、被検組織から試料を取得、培養し、該試料における遺伝子の発現により生成される請求項 4 記載のポリペプチドを測定することを特徴とするグルコーストランスポート機能の診断方法（請求項 23）や、請求項 23 記載のポリペプチドの測定を、請求項 7～9 のいずれか記載の抗体を用いて行うことを特徴とするグルコーストランスポート機能の診断方法（請求項 24）や、請求項 21～24 のいずれか記載のグルコーストランスポート機能の診断が、腎疾患におけるグルコーストランスポート機能の測定であることを特徴とする腎疾患の診断方法（請求項 25）や、動物組織細胞に、請求項 1～3 のいずれか記載の DNA を導入することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコーストランスポート機能の調節方法（請求項 26）や、動物組織細胞における請求項 1 記載の DNA の発現を抑制することを特徴とする動物組織細胞におけるグルコーストランスポート機能の調節方法（請求項 27）や、動物組織細胞における請求項 1 記載の DNA の発現の抑制が、請求項 1 記載の DNA 塩基配列のアンチセンス鎖の全部又は一部を動物組織細胞に導入することにより行われることを特徴とする動物組織細胞グルコ

ーストランスポータ機能の調節方法（請求項 28）や、動物組織細胞が、動物腎細胞であることを特徴とする請求項 26～28 のいずれか記載の動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節方法（請求項 29）からなる。

【0017】

【発明の実施の形態】

（本発明の遺伝子、該遺伝子によってコードされるポリペプチド及びその抗体）

本発明は、腎性糖尿病の原因に関与するグルコーストランスポータ NaGLT1 及びその原因遺伝子、更にはそれらの変異体からなる。

本発明の腎性糖尿病の原因に関与するグルコーストランスポータ NaGLT1 cDNA は、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列を有する。また、該 cDNA によって、コードされるグルコーストランスポータ NaGLT1 タンパク質は、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドからなる。本発明において取得された新規遺伝子であるグルコーストランスポータ NaGLT1 の cDNA は、2,173 の塩基対からなり、その翻訳領域（111～1562 番目）には、484 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドがコードされている。

【0018】

本発明のグルコーストランスポータ NaGLT1 は、疎水性解析の結果からは、11 回膜貫通型の糖タンパク質であることが確認された。本発明の該グルコーストランスポータ NaGLT1 は、腎臓において高発現するグルコーストランスポータであり、他の単糖類は認識せずグルコースを特異的に認識する。腎臓におけるグルコーストランスポータ NaGLT1 の発現量は、既知のグルコーストランスポータ SGLT1 や SGLT2 よりも高く、腎性糖尿病の原因と考えられている腎臓でのグルコースの再吸収に大きな寄与を果たしているものである。

【0019】

本発明の遺伝子としては、前記配列表の配列番号 1 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含む配列、更には、該塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドをコードする DNA 配列、及び、次の(a)

又は(b)のポリペプチドをコードするDNA;

(a)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b)配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを有するポリペプチド、を含むものである。

【0020】

本発明において、種々のDNA配列の変異は、周知の遺伝子工学的遺伝子変異手段によって、行うことができる。

なお、上記本発明の塩基配列において、「塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば種々の要素を組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0021】

更に、本発明は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、該配列表の配列番号に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを含むものである。本発明のポリペプチドを取得するには、公知の遺伝子工学の技術を用いて取得することができる。即ち、本発明の遺伝子を適宜公知の発現ベクターに組み込み、該組換えベクターを宿主細胞に導入し、発現することによって取得することができる。

【0022】

(本発明のポリペプチドによって誘導される抗体の利用)

更に、本発明は、本発明のポリペプチドによって誘導され、該ポリペプチドに

特異的に結合する抗体を含む。該抗体としては、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を挙げることができる。該抗体の作製は、本発明のポリペプチドを抗原として、常法により作製することができる。本発明の抗体は、本発明のグルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドとの抗原抗体反応により、本発明遺伝子の腎組織細胞等における発現の有無の検出に利用することができ、該遺伝子に関わる腎疾患の診断に利用することができる。本発明の抗体を用いた免疫学的測定には、例えばRIA法、ELISA法、蛍光抗体法等公知の免疫学的測定法を用いることができる。

【0023】

(本発明のDNAを導入したヒト組織細胞の利用)

本発明のDNAを、ヒト組織細胞に導入して、グルコーストランスポータ機能を有するポリペプチドを発現するヒト組織細胞を製造することができる。該ヒト組織細胞としては、本来N a G l T 1が強く発現している腎臓の組織細胞を用いることが好ましく、該腎臓の組織細胞の具体例としては、ヒト胎児腎臓の形質転換細胞株H E K 2 9 3を挙げることができる。また、本発明の遺伝子を導入する動物組織細胞としては、ラットの腎臓の組織細胞や、ブタ腎臓由来上皮細胞 L L C - P K ₁、イヌ腎臓由来上皮細胞 M D C K、フクロネズミ腎臓由来上皮細胞 O Kのいずれかの細胞を用いることもできる。本発明のDNAをヒト組織細胞に導入するには、トランスフェクション法等、適宜の遺伝子導入法を用いることができる。

【0024】

(本発明の遺伝子及び該遺伝子によってコードされるポリペプチドの利用)

本発明において、ヒト腎細胞からクローニングしたN a G l T 1の新規遺伝子は、該塩基配列のアンチセンス鎖を用いることにより、診断用プローブとして、腎組織細胞のグルコーストランスポータ機能の診断に用いることができる。また、該診断用プローブや前記本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いて、グルコーストランスポータ機能の診断薬として、及び該診断薬を装備した診断用キットとして利用することができる。

【0025】

更に、本発明のDNAを、少なくとも1つ以上デバイス上に固定して、グルコーストランスポータ機能の診断用マイクロアレイ又はDNAチップとして利用することができる。該マイクロアレイ及びDNAチップには、グルコーストランスポータの他の遺伝子等を合わせて固定し、診断に用いることができる。また、腎組織細胞における本発明の遺伝子の発現の状態を測定するには、RT-PCR法やノーザンブロットィング法等、公知の遺伝子の測定法を適宜用いることができる。本発明の診断法を用いて、腎組織細胞におけるグルコーストランスポータNaGLT1の遺伝子の発現の有無や発現の強度を測定することにより、ヒト腎臓における遺伝子疾患を検出することができる。

【0026】

(本発明の遺伝子を用いたグルコーストランスポータ機能の調節)

ヒト組織細胞における本発明の遺伝子の発現の制御により、ヒト組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節を行うことができる。ヒト組織細胞における遺伝子の発現の制御は、ヒト組織細胞への本発明遺伝子の導入や、本発明遺伝子に対するアンチセンス鎖の導入による本発明遺伝子の発現抑制によって行うことができる。ヒト組織細胞への本発明遺伝子の導入方法としては、トランスフェクション法等の公知の遺伝子導入法を用いることができる。アンチセンス鎖のヒト組織細胞への導入には、この分野で通常用いられる方法を用いることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、腎組織等のヒト組織細胞へ直接投与することができる。また、必要に応じて薬学的に許容される細胞内導入試薬、例えば、リポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、DOTAP試薬、Tfx試薬、リポソーム及び高分子担体等と共に投与することができる。

腎臓等のヒト組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節により、腎臓等における遺伝子疾患の予防・治療が可能となる。

【0027】

(本発明の遺伝子欠損モデル非ヒト動物及びその利用)

本発明の、腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物とは、グルコーストランスポータNaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損することにより、腎臓におけるグルコース再吸収不全のような腎性糖尿病を発症する非ヒト動物をいう。本発明

における非ヒト動物としては、ラット、マウス、モルモット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができ、本発明の腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニングに用いるモデル非ヒト動物としては、マウス、ラットが特に有利に利用することができるが、これらに限定されるものではない。

本発明のNaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル非ヒト動物の作製は、公知の遺伝子欠損モデル非ヒト動物の作製方法を用いて作製することができる。以下に、NaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル非ヒト動物の作製方法を、NaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損したマウスを例にとつて説明する。

【0028】

NaGLT1遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわちホモ接合体変異マウス（-/-）は、例えば、ラット腎臓から構築したラット遺伝子ライブラリーより得られた遺伝子断片を用いて、NaGLT1遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたNaGLT1遺伝子の一部又は全部を、例えばlacZ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子で置換し、必要に応じて、5'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント（DT-A）遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（HSV-tk）遺伝子等の遺伝子を導入してターゲッティングベクターを作製し、この作製されたターゲッティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、X-galによる染色あるいはG418やガンシクロビル（GANC）等の抗生物質に抵抗性を示すES細胞を選択する。この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。

【0029】

上記組換えES細胞をマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体変異マウス（+/-）を得ることができ、また、このヘテロ接合体変異マウスをインタークロスさせることによって、ホモ接合体変異マウス（-/-）を得ることができる。そして、

かかるホモ接合体変異マウスにN a G L T 1 遺伝子が欠損しているかどうかを確認する方法としては、例えば、このマウスのN a G L T 1 遺伝子の発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

【0030】

本発明における、腎臓におけるグルコース再吸収不全に起因する腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニングは、グルコーストランスポータN a G L T 1 遺伝子機能の染色体上での欠損により、腎臓におけるグルコース再吸収不全のような腎性糖尿病を発症する非ヒト動物に、被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物、或いは該モデル非ヒト動物の細胞、組織又は器官におけるグルコース再吸収能を測定・評価することにより行う。

【0031】

上記のように、腎臓におけるグルコース再吸収不全に起因する腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニングをする際、野生型非ヒト動物及び／又はN a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を用いて、グルコース再吸収不全に起因する腎性糖尿病を発症するモデル非ヒト動物の場合と比較・評価することが好ましく、野生型非ヒト動物としては、上記N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル非ヒト動物と同種の動物を意味し、中でも同腹の動物を好適に例示することができ、N a G L T 1 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物は、文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6132-6137, 2000) 記載の方法等によって作製することができる。N a G L T 1 遺伝子機能欠損型と、それらの同腹の野生型は、個体レベルで正確な比較実験・評価 (解析) 等を行うことができる点で同時に用いることが好ましい。

【0032】

(本発明の遺伝子を用いたグルコーストランスポータ機能の調節)

動物組織細胞、特に腎臓における組織細胞における本発明の遺伝子の発現の制御により、動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節を行うことができる。動物組織細胞における遺伝子の発現の制御は、動物組織細胞への本発明遺伝子の導入や、本発明遺伝子に対するアンチセンス鎖の導入による本発明遺伝子の発現抑制によって行うことができる。動物組織細胞への本発明遺伝子の

導入方法としては、トランスフェクション法等の公知の遺伝子導入法を用いることができる。アンチセンス鎖の動物組織細胞への導入には、この分野で通常用いられる方法を用いることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、腎組織等の動物組織細胞へ直接投与することができる。また、必要に応じて薬学的に許容される細胞内導入試薬、例えば、リポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、DOTAP試薬、Tfx試薬、リポソーム及び高分子担体等と共に投与することができる。

腎臓等の動物組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能の調節により、腎性糖尿病等における遺伝子疾患の予防・治療が可能となる。

【0033】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例】

(グルコーストランスポーターNaGLT1のcDNAクローニング)

ラット腎臓より、塩化セシウム密度勾配遠心法により全RNAを抽出し、この全RNAからオリゴdTセルロース(Stratagene社製)を用いてポリA+RNA(mRNA)を精製した。精製したmRNAは、cDNAライブラリー作製キット(Stratagene社製)を用いてラット腎cDNAライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーから、無作為に1,000遺伝子を取り出し、ベクタープライマー(T3プライマー; 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3')を用いてシーケンスを行った。なお、NaGLT1の全長シーケンスについては、下記の表1に記載のとおりプライマー(配列表の配列番号3~12)を設計し(Proligo社に合成依頼)、RISA-384(島津社製)を用いたチェーンターミネーター法により解読を行い、GENETYX-MAC Version 10(SOFTWARE DEVELOPMENT社製、東京)を用いて配列表を作成した。実際のシーケンスは、RISA-384システムにより行った(島津ジェノミックリサーチ(株)に委託解析)。

【0034】

【表 1】

プライマー	塩基配列 (5' → 3')	NaGLT1に おける位置	配列 番号
フォワードプライマー:			
T3-1	TCGGAAATGGAGTTCCGTGG	105-124	3
T3-2	AGCTGCCTTACTGACTGCCATG	494-515	4
T3-3	TACGTATTCTCCTTCGCCACC	996-1016	5
T3-4	TGTGTAACATTGGCAGCCTGG	1144-1164	6
T3-5	TAACCCATAGCTGAGGTCTC	1699-1718	7
リバースプライマー:			
T7-1	CAGATAGTTGTGAGCCACCATGTG	2095-2072	8
T7-2	GAGTTGCTTAGAGACCTCAGC	1728-1708	9
T7-3	AGGTGGTGTACTGCTCAATCC	1293-1273	10
T7-4	TCTGAGGCGGCTTCAAAGGATC	757-737	11
T7-5	AAAAGCACCCACCAACCACAG	409-388	12

【0035】

得られた遺伝子配列情報について、GenBank、EMBL、DDBJ及びPDBの各データベースに登録されている遺伝子配列との相同性解析をBLASTにより行い既知群と未知群に分けた。未知遺伝子約200種は、mRNAをmCap RNA Capping kit (Stratagene社製)を用いてインビトロ合成し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた輸送実験を行った。その結果、代謝抵抗性の α -メチルーD-グルコピラノシド (α MeGlc) を特異的に輸送するクローン (NaGLT1) を同定した (GeneBankアクセッションナンバー: AB089802)。単離されたNaGLT1 cDNAは2,173塩基対からなり (配列番号1)、その翻訳領域 (111~1562番目) には484個のアミノ酸残基からなるタンパク質 (配列番号2) がコードされていた (図1A)。疎水性解析の結果から、NaGLT1は11回膜貫通型の糖タンパク質であることが推測された (図1B)。

【0036】

(ノーザンブロット法及びRT-PCRによるNaGLT1の発現分布の解析)
ストリンジェントな条件下 [50%のホルムアミド、5×SSPE (1×SSPEの組成: 0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄、及び1mM EDTA; pH 7.4)、5×デンハルト溶液、0.2%のSDS及び10 μ g/

mL のニシン精子由来の DNA、42℃] において [α -³²P] dCTP (Amersham 社製) で NaGLT1 の cDNA (全長) を Prime-a-Gene Labeling System (Promega 社製) を用いて標識し、ラット各臓器から RNeasy mini RNA extraction kit (QIAGEN 社製) を用いて全 RNA を抽出し、をプロットしたナイロン膜 (Hybond N+ membrane: Amersham 社製) とハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションを行った後、2×SSC (1×SSC の組成: 0.15M NaCl、15mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0) / 0.1% の SDS で 10 分間室温でプロットメンブレンを 2 度洗浄し、さらに 0.5×SSC / 0.1% SDS で 30 分間 42℃ で 1 度洗浄した。洗浄したプロットメンブレンをイメージングプレートに 3～6 時間露出し、可視化されたバンドをイメージングプレートリーダーで読みとった後、Image Analyze II (富士フイルム社製) で画像処理を行った (Bio-imaging Analyzer BAS-2000II システム、富士写真フイルム株式会社)。それぞれのバンドに相当する放射線強度は、Image Analyze II 上で数値定量化した。その結果、NaGLT1 mRNA は、腎臓の皮質部及び髄質部に多く発現することが認められた (図 2A)。

【0037】

次に、RT-PCR 法で調べるため、ラット各組織 (脳、心臓、肺、肝臓、小腸、脾臓、腎臓の皮質部、腎臓の髄質部) から RNeasy mini kit (QIAGEN 社製) を用いて 1 μ g の全 RNA を得た後、SuperScript II reverse transcriptase (インビトロジェン社製) を用いて逆転写反応を行った。反応終了後残存 RNA を RNase H (インビトロジェン社製) で分解した。得られた 1 本鎖 DNA を鋳型として、NaGLT1、SGLT1、SGLT2 及び GAPDH に特異的なプライマー (下記の表 2 及び配列表の配列番号 13～20 参照) と Taq DNA polymerase (Takara 社製) を使用し、95℃ で 3 分間熱変性させた後、以下のサイクルを 35 回繰り返し増幅させた。サイクル: 94℃ で 1 分間の熱変性、58℃ で 1 分間アニーリング、72℃ で 1 分間の伸長反応により得られた RT-PCR 産物を 1.5% のアガロースゲル上で分離した後、エチジウムブロマイドで染色、紫外線下で可視化した。その結果、腎臓 (皮質部、髄質部) で NaGLT1 が高発現しており、腎臓以外にも、脳、肺及び肝臓でも検出限界以上の発現が認められた (

図 2 B)。

【0038】

【表 2】

プライマー	遺伝子 (GenBank アクセション番号)	(位置)	配列番号
NaGLT1 (AB089802)			
Sense 5' - TGGGACCCACATTTCCAGAC - 3'		(279-298)	13
Antisense 5' - TCTGAGGCGGCTTCAAAGGATC - 3'		(736-757)	14
rSGLT1 (D16101)			
Sense 5' - ATGGACAGTAGCACCTTGAGCC - 3'		(170-191)	15
Antisense 5' - TAGCCCCAGAGAAGATGTCTGC - 3'		(647-668)	16
rSGLT2 (U29881)			
Sense 5' - CATTGTCTCAGGCTGGCACTGG - 3'		(851-872)	17
Antisense 5' - GGACACTGCCACAATGAACACC - 3'		(1289-1310)	18
rGAPDH (M17701)			
Sense 5' - CCTTCATTGACCTCAACTAC - 3'		(131-150)	19
Antisense 5' - GGAAGGCCATGCCAGTGAGC - 3'		(705-724)	20

【0039】

(マイクロダイセクション法によるラット腎尿細管分節の単離)

Wistar系雄性ラット (7週齢) をネンブタール麻酔下正中開腹し、左腎臓を露出させる。下大動脈の左腎動脈分岐点直前頭部側にて結紮する。下大動脈を左右分岐点直前頭部側にて結紮し、左腎動脈直下尾部側において血管に小孔を開ける。続いてその小孔よりポリエチレン医療用チューブ (PE-50, Becton Dickinson社製) を挿入し、10ml 容量のシリンジを用いて過加圧にならないようにA

液 (130 mM の NaCl、5 mM の KCl、1 mM の NaH_2PO_4 、1 mM の硫酸マグネシウム、1 mM の乳酸カルシウム、2 mM の酢酸ナトリウム、5.5 mM D-glucose、10 mM の HEPES、pH 7.4) 10 ml で左腎を前灌流する。灌流腎に鬱血等がないことを確認した後、B 液 (1 mg/ml の collagenase (type I, Sigma 社製)、1 mg/ml のウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma 社製)、10 mM のバナジル酸リボヌクレオシドコンプレックス (インビトロジェン社製) 含有 A 液) 10 ml で灌流し、すばやく摘出する。

【0040】

腎皮質から髓質にわたる角度で切断して厚さ 1~1.5 mm の腎切片を作る。得られた腎切片を 100% O_2 を用いて酸素化しながら B 液中で 37℃、30 分間の振盪後、氷冷 A 液で腎切片を洗浄し、シリコナイズした鋭利な針を用いて以下の尿細管各分節をそれぞれの構造的特徴を基に顕微鏡で観察しながら分離する。単離した各ネフロン分節 (糸球体、近位曲尿細管、近位直尿細管、髓質ヘンレ太い上行脚、皮質ヘンレ太い上行脚、皮質集合管、髓質外層集合管、髓質内層集合管) を糸球体は 20 個、その他の分節は 8 mm を 1 サンプルとして、それぞれの分節サンプルから RNeasy RNA mini kit (QIAGEN 社製) を用いて全 RNA を抽出した。得られた全 RNA と下記の表 3 のプライマーセット (配列番号 21~29) を用いて RT-PCR を行った (図 3)。その結果、NaGLT1 mRNA は他の SGLT と同様、近位曲尿細管及び近位直尿細管で高発現することが明らかになった (図 3)。

【0041】

【表 3】

プライマー	遺伝子 (GenBank アクセション番号)	(位置)	配列番号
NaGLT1 (AB089802)			
forward primer 5'-	CCGGTGTCTCATTTGGTGTCT -3'	(526-547)	21
reverse primer 5'-	ACCCAAGGCGAACTGAAGTG -3'	(618-638)	22
TaqMan probe 5'-	ACAAAGGAGCCCCACATATTCAGGCCTT -3'	(589-616)	23
rSGLT1 (D16101)			
forward primer 5'-	CGAGGAGGACCCTAAAGATACCA -3'	(1912-1934)	24
reverse primer 5'-	GAACAGGTCATATGCCTTCCTGA -3'	(1977-1999)	25
TaqMan probe 5'-	TGAAATAGATGCAGAAGCCCCCAGAAGG -3'	(1936-1964)	26
rSGLT2 (U29881)			
forward primer 5'-	AAAATACGGCAGGAAGGAAGTG -3'	(2117-2138)	27
reverse primer 5'-	GACAAATTGGCCACCATCTTG -3'	(2193-2213)	28
TaqMan probe 5'-	CCAGTCCATTTGATTGGTTGTCACTTCCC -3'	(2163-2191)	29

【 0 0 4 2 】

(N a G L T 1 m R N A 発現レベルの定量的解析)

Wistar系雄性ラット (7週齢) の腎臓由来全RNAを逆転写し (方法2参照)、得られた1本鎖DNAを鋳型として、N a G L T 1、S G L T 1、S G L T 2及びG A P D Hに特異的なプライマー及びT a q M a nプローブ (表3参照) と Universal master mix (Applied Biosystems社製) を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemを用いてN a G L T 1、S G L T 1、S G L T 2及びG A P D H m R N A発現量を定量した。なお、標準曲線を求めるため、リアルタイムPCRで増幅したPCR産物をpGEM-T Easy vector (Promega社製) に挿入し、大腸菌 (DH-5α) に形質転換した。形質転換した大腸菌を一晩LB培地 (1 L中に10 gのバクトトリプトン、5 gのイーストエクストラクト及び10 gのNaCl、pH 7.2) で振盪培養し、N a G L T 1、S G L T 1、S G

L T 2 及び G A P D H それぞれの増幅産物（表 2 のプライマーセットで増幅した P C R 断片）をコードしているプラスミド D N A の精製を行った。

【0043】

それぞれの濃度を U V 1 2 0 0 分光光度計（島津社製）で測定し、既知濃度の対照遺伝子として使用した。PRISM 7700 で得られた結果は、標準曲線を用いて数値化した。なお、内部標準として用いた G A P D H 発現量をリアルタイム P C R 各反応内における鋳型 R N A 量の補正に用いた。その結果、N a G L T 1 m R N A 発現量は、腎皮質及び髄質のいずれにおいても、他の S G L T と比較して高発現することが示された（図 4）。

【0044】

（N a G L T 1 の輸送基質）

アフリカツメガエル卵母細胞（以下卵母細胞と略す）発現系を用いて、N a G L T 1 の輸送活性について調べた。まず、種々の糖類の選択性について調べるためイン ビトロ合成 N a G L T 1 R N A を卵母細胞に注入し、2 日間 1 8 ° C でインキュベートした後実験に供した。放射性標識した単糖類（ α -メチル-D-グルコピラノシド（ α M e G l c : 代謝抵抗性グルコース）、ガラクトース、フルクトース、マンノース、マンニトール及び 2-デオキシグルコース）並びに 2 糖類（スクロース）を基質として調べた結果、 α M e G l c 取り込みのみが、陰性対照として同時に調べた水注入卵母細胞と比較して有意に高かった（図 5）。従って、N a G L T 1 の輸送基質がグルコースであることが明らかになった。

【0045】

（N a G L T 1 を介した α M e G l c 輸送特性）

N a G L T 1 c R N A 注入細胞及び水注入卵母細胞の [U- 14 C] - α -メチル-D-グルコピラノシド（ α M e G l c）、D-[1- 14 C] ガラクトース、D-[U- 14 C] マンノース、D-[U- 14 C] フルクトース、[1, 2- 3 H] - 2-デオキシグルコース、D-[1- 3 H] マンニトール、[U- 14 C] スクロースの取り込み活性を測定した。その際、9.6 mM の N a C l、2 mM の K C l、1.8 mM の C a C l₂、1 mM の M g C l₂、5 mM の H E P E S（p H 7.4）からなる緩衝液中でインキュベートした。また、細胞外 N a⁺濃度

依存性を行う場合は、NaClの濃度を9.6～96mMの間に調製し、96mMに不足する分を塩化コリンで補うこととし、最終的な浸透圧を一定にした(図6、7)。

【0046】

次に、NaGLT1発現卵母細胞を用いて、 α MeGlc取り込みの濃度依存性について調べた結果、 K_m 値は 3.71 ± 0.09 mMを示した(図6A)。また、NaGLT1を介した α MeGlc取り込みに対する細胞外 Na^+ イオン濃度の影響について解析した。はじめに、rNaGLT1の α MeGlc取り込みに対する細胞外 Na^+ の影響は、7 μ Mのvalinomycin添加により膜電位差を無くした状態で、細胞外 Na^+ の濃度を0～96mMまで変化させ検討した。インビトロ合成rNaGLT1 RNAを注入した細胞では細胞外 Na^+ 濃度依存的に α MeGlc取り込みは増大した。また、rNaGLT1の α MeGlc取り込みに対する用量依存性、あるいは細胞外 Na^+ 依存性の検討(図6A、6C)より、各々の V_{max} 値(最大輸送速度)、 K_m 値を算出した。それらの値をもとにヒルプロット(横軸に変化させた基質またはイオンの濃度、縦軸にはそれぞれの基質(またはイオン)濃度の時の輸送速度 V で V_{max} を徐したものの対数値をとる。)を行い(図6B、6D)、ヒル系数(直線の勾配)を算出した。その結果、 α MeGlc、 Na^+ のヒル系数はそれぞれ1.06、1.00であり、 α MeGlcと Na^+ とのカップリング比は1:1であることが示された(図6)。従ってNaGLT1は、細胞外 Na^+ イオン濃度依存的に機能するグルコーストランスポータであることが示唆された。

さらに、NaGLT1発現卵母細胞を介する $[^{14}C]$ 標識 α MeGlc取り込みに対する種々阻害剤の影響について調べた結果、非標識 α MeGlc、D-グルコース、2-デオキシグルコース及びフロリジンは極めて強い阻害効果を有していた。フルクトースやフロレチンは弱い阻害効果を有していた。一方、L-グルコース、3-O-メチルグルコース、ガラクトース及びマンノースはNaGLT1を介した α MeGlc取り込みに対して影響を示さなかった(図7)。

【0047】

(抗NaGLT1抗体の作製)

NaGLT1のアミノ酸配列を基に、C末端側のペプチド ($\text{H}_2\text{N-LPLDRKQEK SINSEGQ-COOH}$) (配列番号30) をN末端側をシステインとして作製した (サワディー・テクノロジー社に合成依頼)。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析の結果、合成されたペプチドの純度は92%であった。続いてヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin (Calbiochem-Behring社製)) を用い、このペプチドとのコンジュゲートを作製した。コンジュゲートは1mlずつ10本に分注し凍結保存した。

コンジュゲートはFreund完全アジュバント (Difco社製) を用いて均一なエマルジョンを作った。雄性日本白色家兎 (2kg) の前免疫血清を採取後、0.2mg/羽の割合で2週間間隔で免疫した。各免疫時に採血し、ELISA法により抗体価の解析を行った。最終的に十分な抗体価が得られた後、全採血して抗血清として凍結保存した。

【0048】

(イムノブロットによるNaGLT1の局在解析)

ペントバルビタール麻酔下Wistar系雄性ラット (220~230g) から各組織を取り出し、ホモジネートバッファー (230mMのスクロース、5mMのトリス/塩酸 (pH 7.5)、2mのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.1mM フッ化フェニルメチルスルフォニル (PMSF)) でホモジナイズした後、15分間の3000gでの遠心分離を行った。上清を取り分け、さらに30分間の24500gでの遠心分離を行い、沈殿物 (粗膜画分) を回収した。ラット腎刷子縁膜及び側底膜の調製はパーコール密度勾配遠心法 (Biochim Biophys Acta 773, 113-124, 1984) に従い同時調製した。膜サンプルはSDSサンプルバッファー (2%のSDS、125mMのトリス、20%グルセロール) に可溶化しポリアクリルアミド電気泳動 (Nature 227, 680-685, 1970) を行った。

【0049】

分子量マーカースには、Rainbow™ colored protein molecular weight markers [myosin (220,000), phosphorylase beta (97,400), BSA (66,000), ovalbumin (46,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (21,500), lysozyme (14,300)] (Amersham社製) を使用した。泳動の後、PVD F膜 (Immobirol

n P、ミリポア社製) にタンパク質をトランスファー後、TBS-T (Tris buffered saline; 20 mMのTris/HCl (pH 7.5)、137 mMのNaCl、0.1%のTween 20) でリンスした。次に5%のBSA含有TBS-Tで室温2時間ブロッキングした後、5%BSA含有TBS-Tで希釈した抗血清(1:2000)と4℃、一晚反応させ、その後TBS-Tで15分、3回膜を洗浄した。そしてECL化学発光キット(Amersham社製)を用いてX線フィルム(富士フィルム社製)に感光させた。その結果、NaGLT1タンパク質は腎臓刷子縁膜に局在することが明らかになった(図8)。なお、図8中の左側は、抗NaGLT1抗体のみと反応させた場合、右側は予め抗原ペプチドで処理した抗NaGLT1抗体で反応させた結果をそれぞれ示す。

【0050】

【発明の効果】

腎性糖尿病は、腎臓におけるグルコース再吸収不全によるものであり、該グルコース再吸収不全はグルコーストランスポータ遺伝子の欠損によると考えられていた。本発明により、従来不明であった遺伝子が取得されたことにより、該遺伝子及び該遺伝子の発現産物であるグルコーストランスポータタンパク質を用いて、腎性糖尿病の解明、診断、予防・治療そのための薬剤の開発が可能となった。

例えば、本発明の遺伝子及びペプチド、更には該ペプチドに特異的に結合する抗体を用いて、例えば、ヒト腎におけるような新たなグルコーストランスポータ遺伝子の単離を行うことや、ヒトやラット組織細胞におけるグルコーストランスポータの発現を測定することが、新規遺伝子の単離やグルコーストランスポータの機能の診断、腎臓における遺伝子疾患の検出が可能となる。

【0051】

また、腎組織細胞のような組織細胞への本発明の遺伝子の導入や、本発明の遺伝子のアンチセンス鎖の導入による該遺伝子の発現抑制により、組織細胞におけるグルコーストランスポータ機能を調節することにより、腎遺伝子疾患の予防・治療を行うことも可能となる。更に、本発明の遺伝子の染色体上での欠損動物を作製することにより、グルコーストランスポータに着目した腎性糖尿病非ヒトモデル動物を作製することが可能である。該非ヒトモデル動物を用いることにより

、腎性糖尿病の予防及び治療のための新規薬剤の開発が可能となる。

【 0 0 5 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Na⁺-dependent Glucose transporter 'NaGLT1' gene and its transcript
ion-products.

<130> Y2002-P281

<140>

<141>

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2173

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (111)..(1562)

<400> 1

aaagaatctt ctggttagaa agaactgggg ctgagagctc cagggaccct ggcaaaaagc 60

tggacctcac caaaaaccct ttgtctggag ccaccaagct ggggtcggaa atg gag 116

Met Glu

1

ttc cgt ggg tcc ggg gcc act gct gtt gag cag cac ctc ctc cag tcc 164

Phe Arg Gly Ser Gly Ala Thr Ala Val Glu Gln His Leu Leu Gln Ser

5

10

15

gag acc cca ggg aag aat ggg ctg cag gcc aca tcg agt gac caa gtg 212

Glu Thr Pro Gly Lys Asn Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Asp Gln Val

20

25

30

gga aga aca ctg cgc tgg ttc acc act gtg gtt ctg aat gct gct ttc 260

Gly Arg Thr Leu Arg Trp Phe Thr Thr Val Val Leu Asn Ala Ala Phe

35

40

45

50

ctg gga atg gga gtg agc gct gct gtg ctg gga ccc aca ttt cca gac 308

Leu Gly Met Gly Val Ser Ala Ala Val Leu Gly Pro Thr Phe Pro Asp

55

60

65

ctg gcc aga aac gtg aac cgg aac atc agc agc ctt tcc gaa atc ttc 356

Leu Ala Arg Asn Val Asn Arg Asn Ile Ser Ser Leu Ser Glu Ile Phe

70

75

80

gtg ggc cga gcc ctc ggc tac ctg ggc ggc tct gtg gtt ggt ggg gtg 404

Val Gly Arg Ala Leu Gly Tyr Leu Gly Gly Ser Val Val Gly Gly Val

85

90

95

ctt ttc gac tgc atg aat cat ttt cta ctt ttg ggg ctg tcc cac ctg 452
 Leu Phe Asp Cys Met Asn His Phe Leu Leu Leu Gly Leu Ser His Leu
 100 105 110

ctt act gcg gcc ggt ctt tac ctc act cct ttc tgt aaa aca gct gcc 500
 Leu Thr Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Thr Pro Phe Cys Lys Thr Ala Ala
 115 120 125 130

tta ctg act gcc atg atg tct att acc ggt gtc tca ttt ggt gtt ctg 548
 Leu Leu Thr Ala Met Met Ser Ile Thr Gly Val Ser Phe Gly Val Leu
 135 140 145

gat aca ggt ggg aat gtc ctc atc ttg gac ctt tgg ggg gac aaa gga 596
 Asp Thr Gly Gly Asn Val Leu Ile Leu Asp Leu Trp Gly Asp Lys Gly
 150 155 160

gcc cca cat att cag gcc ttg cac ttc agt ttc gcc ttg ggt gcc ttc 644
 Ala Pro His Ile Gln Ala Leu His Phe Ser Phe Ala Leu Gly Ala Phe
 165 170 175

ctg gct ccc ctg ctg gct aaa ttg gcc tgg ggt acc aca gca tct gct 692
 Leu Ala Pro Leu Leu Ala Lys Leu Ala Trp Gly Thr Thr Ala Ser Ala
 180 185 190

cag aac cac aca gag cct cag tta gac cgt tca gcc ttg aac cga tcc 740
 Gln Asn His Thr Glu Pro Gln Leu Asp Arg Ser Ala Leu Asn Arg Ser
 195 200 205 210

ttt gaa gcc gcc tca gac tct gtg ttg gcg gta cct gac gac atg aat 788
 Phe Glu Ala Ala Ser Asp Ser Val Leu Ala Val Pro Asp Asp Met Asn
 215 220 225

ctt ctg tgg gcg tac gct tcc att gga acc tat gtt cta gta ctt tct 836
 Leu Leu Trp Ala Tyr Ala Ser Ile Gly Thr Tyr Val Leu Val Leu Ser
 230 235 240

gtc ttc ctg ttt gct cca ttc ttt aaa aag agg tca aag cag aaa aaa 884
 Val Phe Leu Phe Ala Pro Phe Phe Lys Lys Arg Ser Lys Gln Lys Lys
 245 250 255

tcc gca gcg tct gct cag gga gct cga agg gct aaa tac cac agg gcc 932
 Ser Ala Ala Ser Ala Gln Gly Ala Arg Arg Ala Lys Tyr His Arg Ala
 260 265 270

ctg cta tgc ctc ctc ttc ctc ttc ttc ttc ttc tac gtg gga gcg gag 980
 Leu Leu Cys Leu Leu Phe Leu Phe Phe Phe Phe Tyr Val Gly Ala Glu
 275 280 285 290

gtg acc tac ggc tct tac gta ttc tcc ttc gcc acc acc cac gtt ggc 1028
 Val Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Ser Phe Ala Thr Thr His Val Gly
 295 300 305

atg gaa gag agc gag gca gct ggc ttg aac tcc atc ttc tgg ggg acc 1076
 Met Glu Glu Ser Glu Ala Ala Gly Leu Asn Ser Ile Phe Trp Gly Thr
 310 315 320

ttc gca gcc tgc agg ggc ctg gcc atc ttc ttc gca acg ctc tta cag 1124

Phe Ala Ala Cys Arg Gly Leu Ala Ile Phe Phe Ala Thr Leu Leu Gln
 325 330 335

cct ggg acc atg atg gtg ttg tgt aac att ggc agc ctg gcc tca tct 1172
 Pro Gly Thr Met Met Val Leu Cys Asn Ile Gly Ser Leu Ala Ser Ser
 340 345 350

ttc ttt ctg gtg ctt ttt gac aag agc cct ctt tgc ctc tgg atc gcg 1220
 Phe Phe Leu Val Leu Phe Asp Lys Ser Pro Leu Cys Leu Trp Ile Ala
 355 360 365 370

tct tct gtg tat gga gcc tca atg gct gcc acg ttt ccc agc ggc atc 1268
 Ser Ser Val Tyr Gly Ala Ser Met Ala Ala Thr Phe Pro Ser Gly Ile
 375 380 385

tcc tgg att gag cag tac acc acc tta act ggg aaa tcc gct gcg ttc 1316
 Ser Trp Ile Glu Gln Tyr Thr Thr Leu Thr Gly Lys Ser Ala Ala Phe
 390 395 400

att ctg gtt ggt gct gcc ctg gga cta atg gcg act cct gca tta tct 1364
 Ile Leu Val Gly Ala Ala Leu Gly Leu Met Ala Thr Pro Ala Leu Ser
 405 410 415

gga att ctt cag gga cac tat ccc gat ctg cca gta att ctg tac atg 1412
 Gly Ile Leu Gln Gly His Tyr Pro Asp Leu Pro Val Ile Leu Tyr Met
 420 425 430

tgt ctg ggc tca gca gta tta aca act gtg tta ttc cct gtg atg tat 1460
 Cys Leu Gly Ser Ala Val Leu Thr Thr Val Leu Phe Pro Val Met Tyr

435 440 445 450

aaa gta gcc acc tta cct ctg gat cga aag cag gaa aaa agc atc aac 1508
Lys Val Ala Thr Leu Pro Leu Asp Arg Lys Gln Glu Lys Ser Ile Asn

 455 460 465

agt gag ggc cag aaa ata tta ctt tct agc tct agg cta atc aag gaa 1556
Ser Glu Gly Gln Lys Ile Leu Leu Ser Ser Ser Arg Leu Ile Lys Glu

 470 475 480

gct aaa tgaaagagga aggggaaagg tgtgaaagca cgtgcgcgcg tgtgtgcgca 1612
Ala Lys

tgcacgcgca cgcgtaatgg ttttgcggtg gttaaaatga agaatgggac attctctaatt 1672

aaaaatacaa tagaaatgcc tttatataac ccatagctga ggtctctaag caactctcct 1732

gaaatattct gcagccaggg tcttctccag ctgacaggga gcacgcagtc atgaggcacc 1792

aggtctcctg agaccctta cactgcctc attgaagtta tctctcagcc catgattcta 1852

ggaaagaaaa gtatttctaa aataaaatcc acgacttcca gagatcctgt aagacagctc 1912

tgagagatca atgtaactgc cagcaccttc ttcatttcca tgaagtgaga cacagaacag 1972

aaatagtttt aaacgtatgc tcctggggct ggtgagatgg cttagtggtt aagagcactg 2032

actgctcttc caaaggtcct gaggttcaaatt cccagcaacc acatggtggc tcacaactat 2092

ctgtaatgag atctgatgcc ttcttctggt gtgtctgaag acagcgacag tgtactcata 2152

tacatcaaat aaataatatt t 2173

<210> 2

<211> 484

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Glu Phe Arg Gly Ser Gly Ala Thr Ala Val Glu Gln His Leu Leu

1 5 10 15

Gln Ser Glu Thr Pro Gly Lys Asn Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Asp

20 25 30

Gln Val Gly Arg Thr Leu Arg Trp Phe Thr Thr Val Val Leu Asn Ala

35 40 45

Ala Phe Leu Gly Met Gly Val Ser Ala Ala Val Leu Gly Pro Thr Phe

50 55 60

Pro Asp Leu Ala Arg Asn Val Asn Arg Asn Ile Ser Ser Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Phe Val Gly Arg Ala Leu Gly Tyr Leu Gly Gly Ser Val Val Gly

85 90 95

Gly Val Leu Phe Asp Cys Met Asn His Phe Leu Leu Leu Gly Leu Ser
100 105 110

His Leu Leu Thr Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Thr Pro Phe Cys Lys Thr
115 120 125

Ala Ala Leu Leu Thr Ala Met Met Ser Ile Thr Gly Val Ser Phe Gly
130 135 140

Val Leu Asp Thr Gly Gly Asn Val Leu Ile Leu Asp Leu Trp Gly Asp
145 150 155 160

Lys Gly Ala Pro His Ile Gln Ala Leu His Phe Ser Phe Ala Leu Gly
165 170 175

Ala Phe Leu Ala Pro Leu Leu Ala Lys Leu Ala Trp Gly Thr Thr Ala
180 185 190

Ser Ala Gln Asn His Thr Glu Pro Gln Leu Asp Arg Ser Ala Leu Asn
195 200 205

Arg Ser Phe Glu Ala Ala Ser Asp Ser Val Leu Ala Val Pro Asp Asp
210 215 220

Met Asn Leu Leu Trp Ala Tyr Ala Ser Ile Gly Thr Tyr Val Leu Val
225 230 235 240

Leu Ser Val Phe Leu Phe Ala Pro Phe Phe Lys Lys Arg Ser Lys Gln
245 250 255

Lys Lys Ser Ala Ala Ser Ala Gln Gly Ala Arg Arg Ala Lys Tyr His
260 265 270

Arg Ala Leu Leu Cys Leu Leu Phe Leu Phe Phe Phe Tyr Val Gly
275 280 285

Ala Glu Val Thr Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Ser Phe Ala Thr Thr His
290 295 300

Val Gly Met Glu Glu Ser Glu Ala Ala Gly Leu Asn Ser Ile Phe Trp
305 310 315 320

Gly Thr Phe Ala Ala Cys Arg Gly Leu Ala Ile Phe Phe Ala Thr Leu
325 330 335

Leu Gln Pro Gly Thr Met Met Val Leu Cys Asn Ile Gly Ser Leu Ala
340 345 350

Ser Ser Phe Phe Leu Val Leu Phe Asp Lys Ser Pro Leu Cys Leu Trp
355 360 365

Ile Ala Ser Ser Val Tyr Gly Ala Ser Met Ala Ala Thr Phe Pro Ser
370 375 380

Gly Ile Ser Trp Ile Glu Gln Tyr Thr Thr Leu Thr Gly Lys Ser Ala
385 390 395 400

Ala Phe Ile Leu Val Gly Ala Ala Leu Gly Leu Met Ala Thr Pro Ala

405

410

415

Leu Ser Gly Ile Leu Gln Gly His Tyr Pro Asp Leu Pro Val Ile Leu

420

425

430

Tyr Met Cys Leu Gly Ser Ala Val Leu Thr Thr Val Leu Phe Pro Val

435

440

445

Met Tyr Lys Val Ala Thr Leu Pro Leu Asp Arg Lys Gln Glu Lys Ser

450

455

460

Ile Asn Ser Glu Gly Gln Lys Ile Leu Leu Ser Ser Ser Arg Leu Ile

465

470

475

480

Lys Glu Ala Lys

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-1 forward
primer

<400> 3

tcggaaatgg agttccgtgg

20

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-2 forward
primer

<400> 4

agctgcctta ctgactgcca tg

22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-3 forward
primer

<400> 5

tacgtattct ccttcgccac c

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-4 forward
primer

<400> 6

tgtgtaacat tggcagcctg g

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T3-5 forward
primer

<400> 7

taacccatag ctgaggtctc

20

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-1 reverse
primer

<400> 8

cagatagttg tgagccacca tgtg

24

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-2 reverse
primer

<400> 9

gagttgctta gagacctcag c

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-3 reverse
primer

<400> 10

aggtggtgta ctgctcaatc c

21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-4 reverse
primer

<400> 11

tctgaggcgg cttcaaagga tc

22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7-5 reverse
primer

<400> 12

aaaagcacc caccaaccac ag

22

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 sense
primer

<400> 13

tgggaccac atttccagac

20

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1
antisense primer

<400> 14

tctgaggcgg cttcaaagga tc

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1

sense primer

<400> 15

atggacagta gcaccttgag cc

22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence::Rat SGLT1

antisense primer

<400> 16

tagccccaga gaagatgtct gc

22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2 sense
primer

<400> 17

cattgtctca ggctggcact gg

22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2
antisense primer

<400> 18

ggacactgcc acaatgaaca cc

22

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat GAPDH sense
primer

<400> 19

ccttcattga cctcaactac

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat GAPDH
antisense primer

<400> 20

ggaaggccat gccagtgagc

20

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 forward
primer

<400> 21

ccggtgtctc atttggtggt ct

22

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 reverse
primer

<400> 22

acccaaggcg aaactgaagt g

21

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1 TaqMan
probe

<400> 23

acaaaggagc cccacatatt caggcctt

28

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1
forward primer

<400> 24

cgaggaggac cctaaagata cca

23

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1
reverse primer

<400> 25

gaacaggtca tatgccttcc tga

23

<210> 26

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT1

TaqMan probe

<400> 26

tgaaatagat gcagaagccc cccagaagg

29

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2

forward primer

<400> 27

aaaatacggc aggaaggaac tg

22

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2
reverse primer

<400> 28

gacaaattgg ccaccatctt g

21

<210> 29

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Rat SGLT2
TaqMan probe

<400> 29

ccagtccatt tgattggttg tcacttccc

29

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:NaGLT1

C-terminal peptide

<400> 30

Leu Pro Leu Asp Arg Lys Gln Glu Lys Ser Ile Asn Ser Glu Gly Gln

1

5

10

15

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施例において、Aは本発明のNaGLT1の塩基配列及びアミノ酸配列を、Bは本発明のNaGLT1のアミノ酸配列のハイドロパシープロット（疎水性分析）を示す図である。

【図 2】

本発明の実施例において、Aは本発明のラット細胞におけるNaGLT1 mRNAのノーザンブロット分析を、Bは本発明のラット細胞におけるNaGLT1 mRNAをPCRにより検出したことを示す図である。

【図 3】

本発明の実施例における、本発明のNaGLT1、SGLT1、SGLT2及びGAPDHのmRNAをPCRにより検出し、それぞれのmRNAについて腎臓内での発現分布を示す図である。なお、図中の+は逆転写酵素を含む条件で、-は逆転写酵素を含まない条件でRT-PCRを行ったものをそれぞれ示す。

【図 4】

本発明の実施例における、本発明のNaGLT1、SGLT1及びSGLT2 mRNAの発現量をリアルタイムPCRによって定量解析したことを示す図である。

【図 5】

本発明の実施例における、本発明のNaGLT1 mRNAをインビトロ合成し、注入した卵母細胞と、水注入卵母細胞における各種糖類蓄積を示す図である。

。

【図 6】

本発明の実施例において、Aは本発明のNaGLT1発現卵母細胞における $[^{14}\text{C}]\alpha\text{MeGl c}$ 蓄積量と $\alpha\text{MeGl c}$ 自身の依存関係を、BはAのデータを用いたHillプロットを、Cは $[^{14}\text{C}]\alpha\text{MeGl c}$ 蓄積量と細胞外 Na^+ イオン濃度の依存関係を、DはCのデータを用いたHillプロットを示す図である。

【図 7】

本発明の実施例における、本発明のNaGLT1発現卵母細胞及び水注入卵母細胞における、 $[^{14}\text{C}]\alpha\text{MeGl c}$ 蓄積に対する各種糖類の影響を示す図である。

【図 8】

本発明の実施例における、ラット腎臓膜部位（腎粗膜、刷子縁膜、及び側底膜）におけるNaGLT1タンパク質の細胞内局在を、イムノプロットにより解析した結果を示す図である。

【書類名】

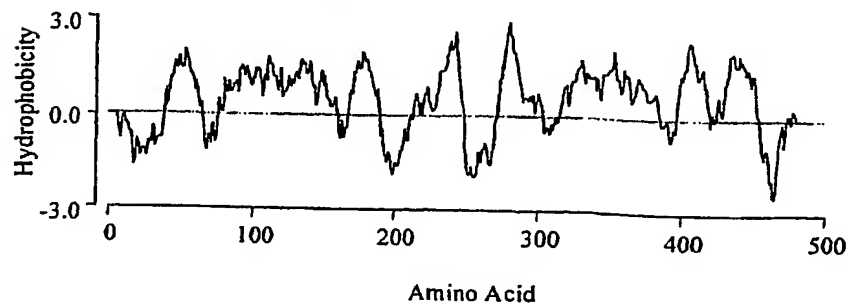
図面

【図1】

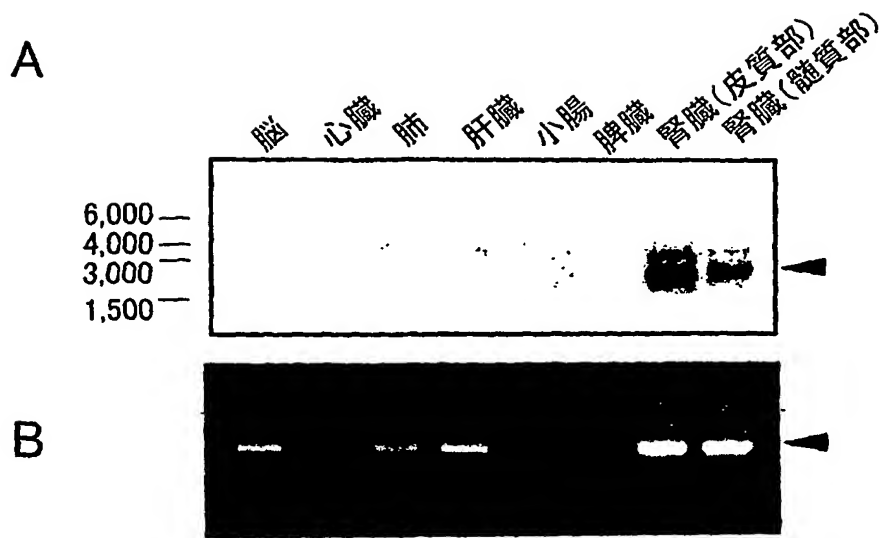
A

AAAGAATCTTCTGGTTAGAAAGAACTGGGGCTCAGAGCTCCAGGGACCCT -61
GGCAAAAAGCTGGACCTCACCAAAAACCTTTGTCTGGAGCCACCAAGCTGGGGTCGGAA -1
1 ATGGAGTCCGTTGGGTCGGGGCCACTGCTGTTGAGCAGCACCTCTCCAGTCCGAGACC 60
M E P R G S G A T A V E Q H L L O S E T
61 CCAGGGAAGAATGGGCTGCAGGCCACATCGAGTGACCAAGTGGGAAGAACACTGCGCTGG 120
P G K N G L Q A T S S D Q V G R T L R W
121 TTCACCACTGTGGTTCTGAATGCTGCTTTCTGGGAATGGGAGTGAGCGCTGCTGTGCTG 180
P T T V V L N A A P L G M G V S A A V L
181 GGACCCACATTTCAGACCTGGCCAGAAACGTGAACCGGAACATCAGCAGCCTTTCCGAA 240
G P T F P D L A R N V N R N I S S L S E
241 ATCTTCGTGGGCGGAGCCCTCGGCTACCTGGGCGGCTCTGTGGTTGGTGGGGTGCTTTTC 300
I F V G R A L G Y L G G S V V G G V L F
301 GACTGCATGAATCATTTTCTACTTTTGGGGCTGTCCACCTGCTTACTGCGGCGGCTCTT 360
D C M N H F L L L G L S H L L T A A G L
361 TACCTCACTCCTTTCTGTAAACAGCTGCCTTACTGACTGCCATGATGTCTATTACCGGT 420
Y L T P F C K T A A L L T A M M S I T G
421 GTCTCATTGGTGTCTGGATACAGGTGGGAATGCTCTCATCTTGGACCTTTGGGGGGAC 480
V S F G V L D T G G N V L I L D L W G D
481 AAAGGAGCCCCACATATTAGGCCTTGCACTTCAGTTTCGCTTGGGTGCTTCTGGCT 540
K G A P H I Q A L H F S P A L G A P L A
541 CCCCTGCTGGCTAAATGGCCTGGGGTACCACAGCATCTGCTCAGAACCACACAGAGCCT 600
P L L A K L A W G T T A S A Q N H T E P
601 CAGTTAGACCGTTACGCTTGAACCGATCCTTTGAAGCCGCTCAGACTCTGTGTGGCG 660
Q L D R S A L N R S F E A A S D S V L A
661 GTACCTGACGACATGAATCTTCTGTGGGCGTACGCTTCCATTGGAACCTATGTTCTAGTA 720
V P D D M N L L W A Y A S I G T Y V L V
721 CTTTCTGTCTTCTCTGTGCTCCTTCTTTAAAGAGAGGTCAAAGCAGAAAAATCCGCA 780
L S V F L P A P F F K K R S K Q K K S A
781 GCGTCTGCTCAGGGAGCTCGAAGGGCTAAATACCACAGGGCCCTGCTATGCCTCTCTTC 840
A S A Q G A R R A K Y H R A L L C L L F
841 CTCTTCTTCTTCTTCTACGTGGGAGCGGAGGTGACCTACGGCTCTTACGTATTCTCCTTC 900
L F F F F Y V G A E V T Y G S Y V F S P
901 GCCACCACCCACGTTGGCATGGAAGAGAGCGAGGCGAGCTGGCTTGAACCTCCATCTTGG 960
A T T H V G M E E S E A A G L N S I F W
961 GGGACCTTCGACGCTGCAGGGGCTGCCATCTTCTTCGCAACGCTTTACAGCCTGGG 1020
G T F A A C R G L A I F F A T L L Q P G
1021 ACCATGATGGTGTGTGTAACATTGGCAGCTGGCCTCATCTTTCTTCTGGTGTCTTTT 1080
T M H V L C N I G S L A S S P F L V L F
1081 GACAAGAGCCCTCTTTGCCCTTGGATCGCGTCTTCTGTGTATGGAGCCTCAATGGCTGCC 1140
D K S P L C L W I A S S V Y G A S M A A
1141 ACGTTTCCAGCGCATCTCTGGATTGAGCAGTACACCACCTTAAGTGGGAAATCCGCT 1200
T F P S G I S W I E O Y T T L T G K S A
1201 GCGTTCATTCTGGTGGTGGCTGCGCTGGGACTAATGGCGACTCCTGCATTATCTGGAATT 1260
A F I L V G A A L G L M A T P A L S G I
1261 CTTAGGGACACTATCCGATCTGCCAGTAATCTGTACATGTGTCTGGGCTCAGCAGTA 1320
L Q G H Y P D L P V I L Y M C L G S A V
1321 TTAACAACCTGTGTTATTCCCTGTGATGTATAAAGTAGCCACCTTACCTCTGGATCGAAAG 1380
L T T V L F P V M Y K V A T L P L D R K
1381 CAGGAAAAAGCATCAACAGTGAGGGCCAGAAAATATTACTTCTAGCTCTAGGCTAATC 1440
Q E K S I N S E G Q K I L L S S S R L I
1441 AAGGAAGCTAAATGAAAGAGGAAGGGGAAAGGTGTGAAGACGCTGCGCGCTGTGTGCG 1500
K E A K
1501 CATGCACCGCACGCGTAATGGTTTTCGGGTGGTTAAATGAAGATGGGACATTCTCTA 1560
ATAAAAAATACAAATAGAAATCCCTTATATAACCCATAGCTGAGGTCTCTAAGCRACTCTC 1620
1621 CTGAAATATTCTGCAGCCAGGGTCTTCTCCAGCTGACAGGGAGCACGCAATCATGAGGCA 1680
1681 CCAGGTCTCTGAGACCCCTTACACTGCCCTCATTGAAGTTATCTCTCAGCCCATGATTC 1740
1741 TAGGAAAGAAAAGTATTCTAAATAAAATCCAGCACTCCAGAGATCTGTAAAGACAG 1800
1801 TCTGAGAGATCAATGTAACAGCCAGCACCTTCTTCAATTTCCATGAAGTGAGACACAGAAC 1860
1861 AGAAATAGTTTAAACGATGCTCCTGGGGCTGGTGAGATGGCTTAGTGGTTAAGAGCAC 1920
1921 TGACTGCTCTTCCAAAGGTCTGAGTTCAAATCCAGCAACCAATGGTGGCTCACAAC 1980
1981 ATCTGTAATGAGATCTGATGCTTCTTCTGGTGTGTCTGAAGACAGGACAGTGTACTCA 2040
2041 TATACATCAAATAAATAATATTT 2063

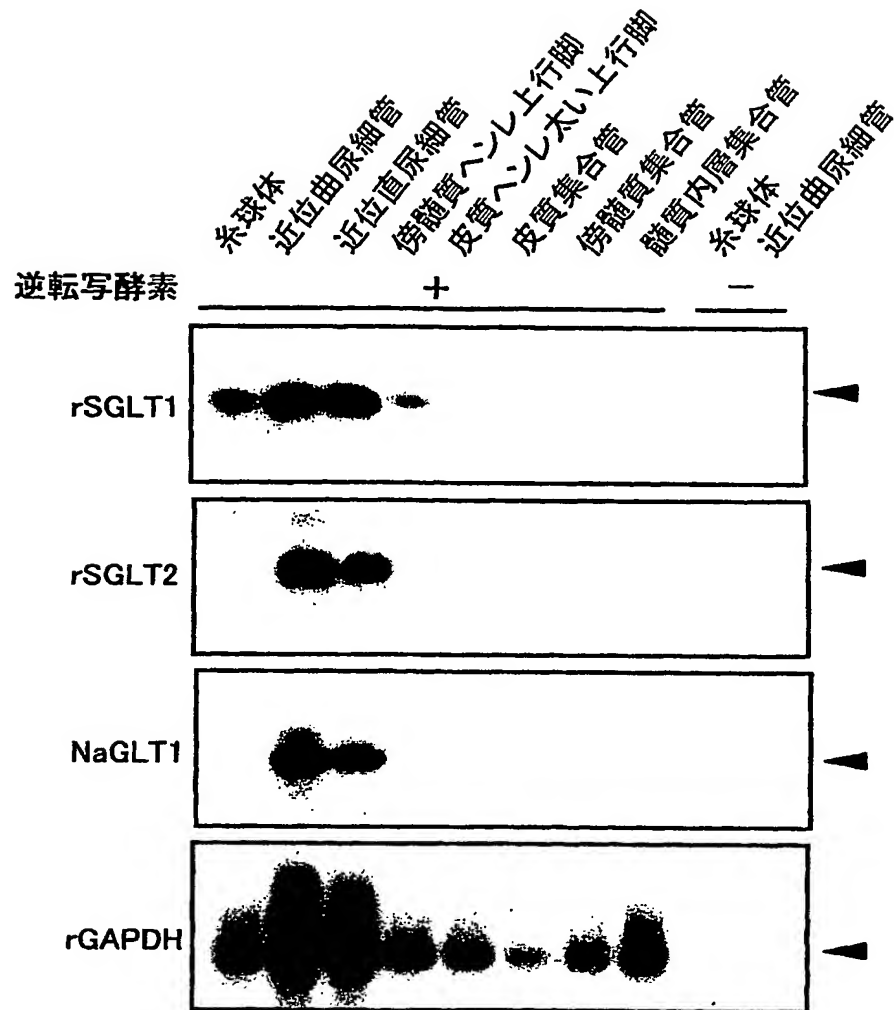
B



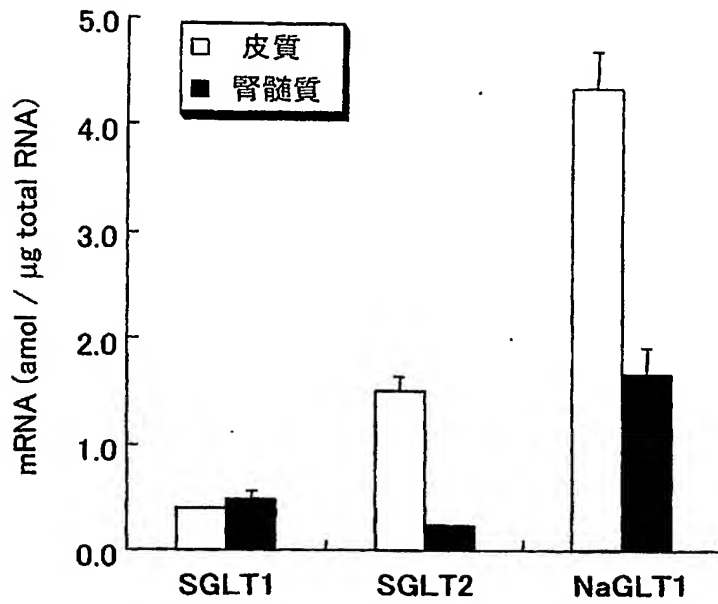
【図 2】



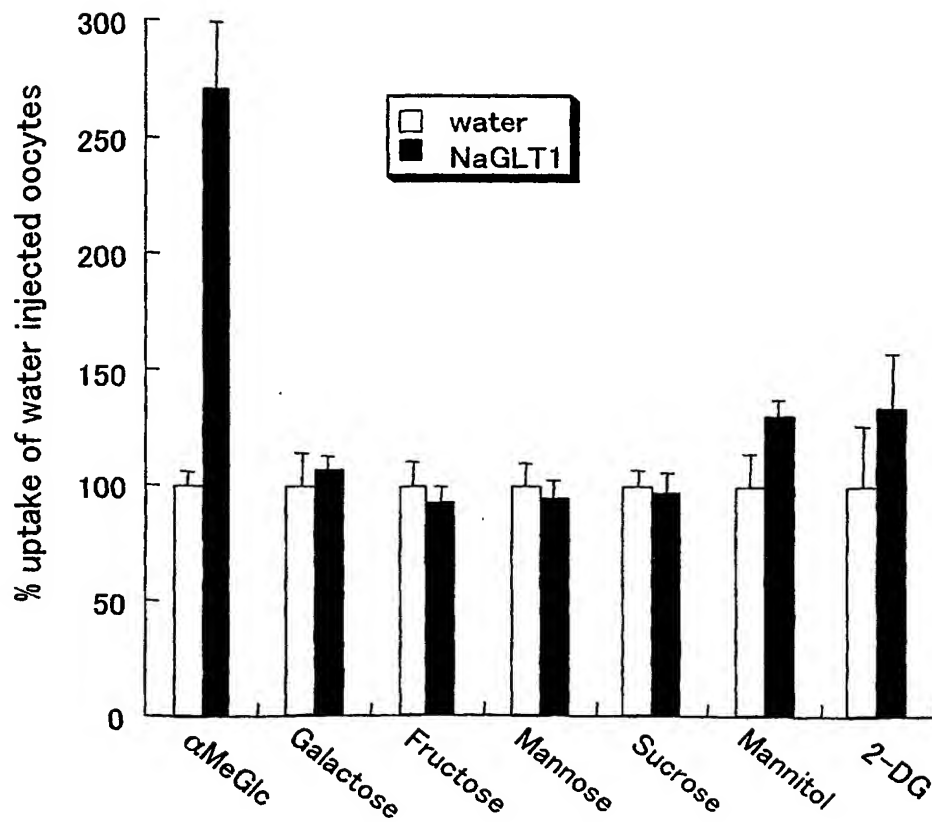
【図 3】



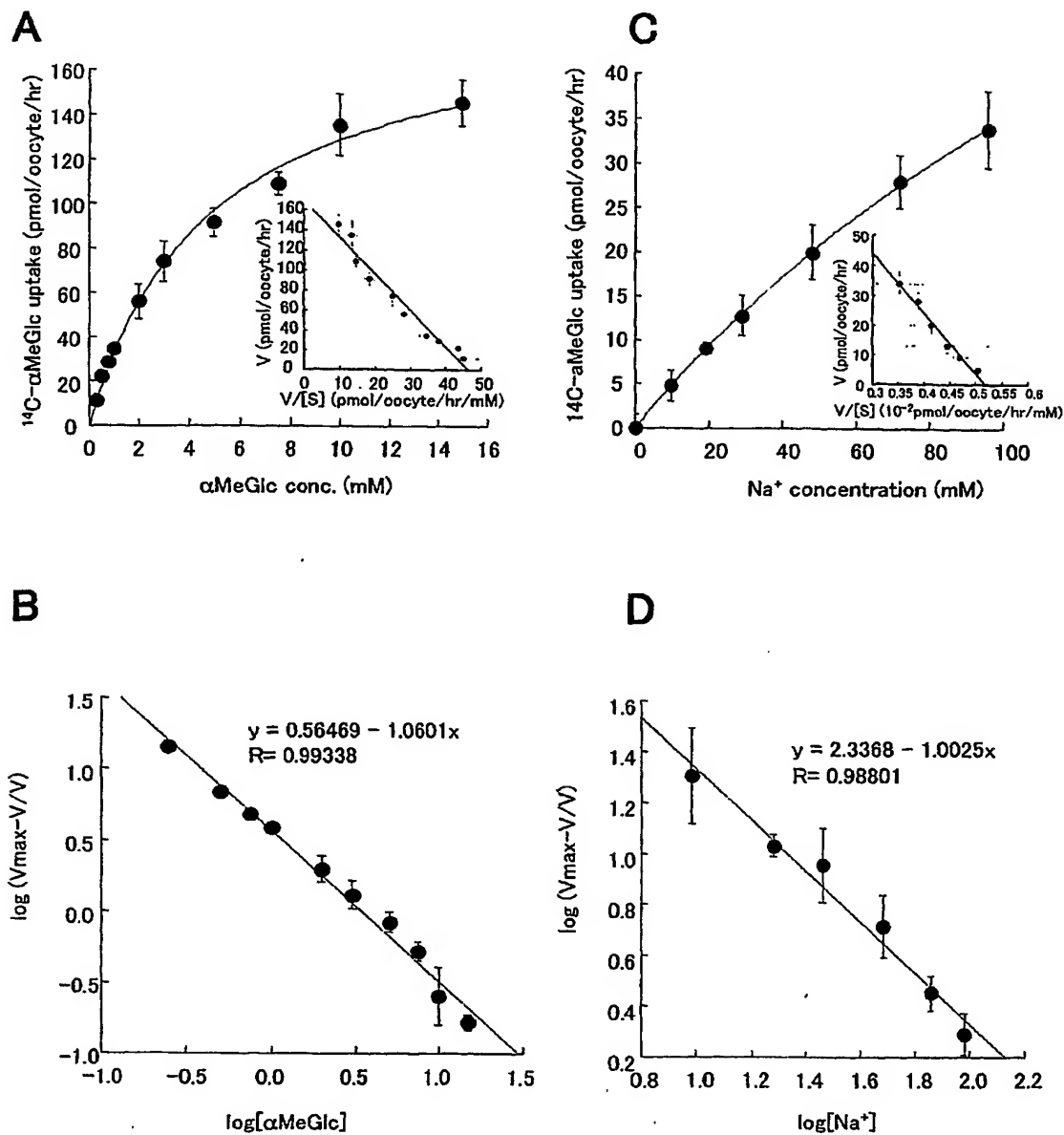
【図 4】



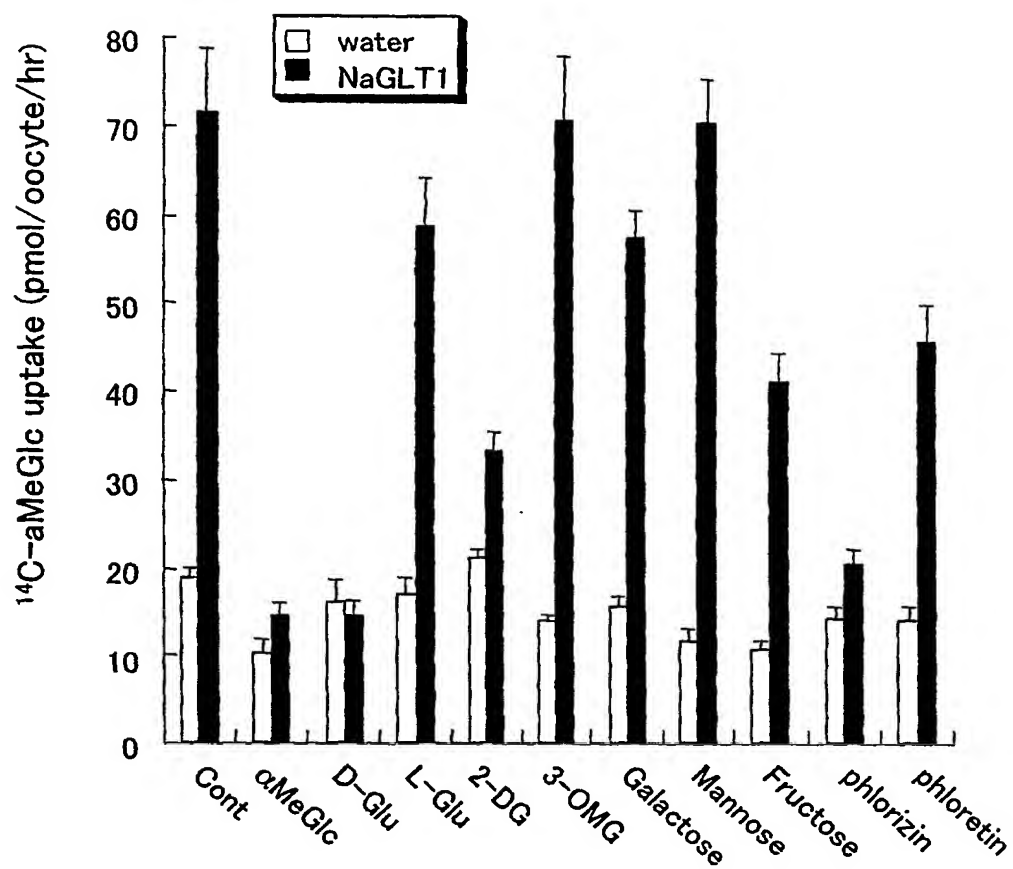
【図 5】



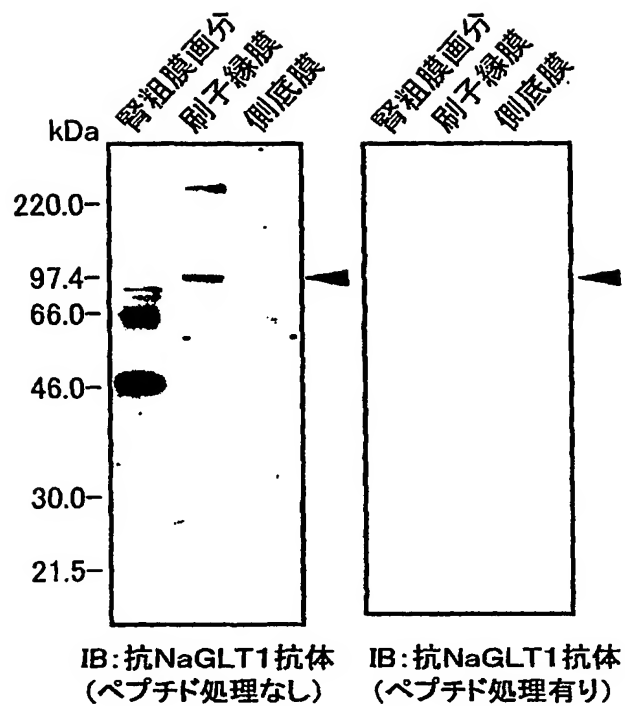
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腎性糖尿病に関与する新規グルコーストランスポータ、その遺伝子、及びそれらの変異体、及び、それらの利用を提供すること。

【解決手段】 本発明のグルコーストランスポータ及びその遺伝子は、腎性糖尿病に関与するグルコーストランスポータ及びその遺伝子であり、該タンパク質及び遺伝子は、腎臓で高発現し、腎でのグルコース再吸収において、より大きな寄与を果たす新規タンパク質及びその遺伝子からなる。本発明は、該タンパク質及び遺伝子の変異体、及び該タンパク質に特異的に結合する抗体を包含する。更に、本発明は、本発明の遺伝子を染色体上で欠損させたモデル非ヒト動物、腎性糖尿病の予防・治療薬のスクリーニング方法、該遺伝子や抗体を用いたグルコーストランスポータ機能や腎疾患の診断方法や本発明の遺伝子を組織細胞に導入して該組織細胞のトランスポータ機能を調節する方法も包含する。

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2002-363014
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417
【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2002-363014

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1998年 2月24日
名称変更
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
科学技術振興事業団

特願 2 0 0 2 - 3 6 3 0 1 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構